

S4  
? t 4/9 1 PN=JP 3202764

4/9/1  
DIALOG(R) File 347:JAPIO  
(c) 1998 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

03539864  
BIOSENSOR AND MANUFACTURE THEREOF

PUB. NO.: 03-202764 [JP 3202764 A]  
PUBLISHED: September 04, 1991 (19910904)  
INVENTOR(s): KAWAGURI MARIKO

OTANI MAYUMI  
NANKAI SHIRO  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
IIJIMA TAKASHI

APPLICANT(s): MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD [000582] (A Japanese Company  
or Corporation), JP (Japan)

APPL. NO.: 02-113316 [JP 90113316]  
FILED: April 27, 1990 (19900427)

INTL CLASS: [5] G01N-027/327

JAPIO CLASS: 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing)

JAPIO KEYWORD: R042 (CHEMISTRY -- Hydrophilic Plastics); R125 (CHEMISTRY --  
Polycarbonate Resins); R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)  
JOURNAL: Section: P, Section No. 1282, Vol. 15, No. 471, Pg. 30,  
November 28, 1991 (19911128)

ABSTRACT

PURPOSE: To measure the concentration of a substrate in the specimen of an organism readily and to improve measuring accuracy by forming an enzyme reaction layer comprising the mixture of oxidoreductase, hydrophilic macromolecules and an electron acceptor on the surface of an electrode system.

CONSTITUTION: Conductive carbon paste is printed on an insulating substrate 1. The paste is heated and dried, and an electrode system comprising a counter electrode 2 and a measuring electrode 3 is formed. Then, an insulating layer 4 is formed so that parts 2' and 3' of the electrodes which are to become the electrochemically acting parts are made to remain. The aqueous solution of carboxymethylcellulose (CMC) which is one kind of hydrophilic macromolecules is applied so as to cover the surfaces of the electrode systems 2' and 3'. The mixture of oxidoreductase and an electron acceptor is dropped on the CMC, heated and dried. Thus an enzyme reaction layer 5 is formed. Glucose standard liquid as specimen liquid is dropped on the reaction layer 5 in this glucose sensor. A constant voltage is applied to the measuring electrode 3 with the counter electrode as a reference, and the current is measured. The current value corresponds to the concentration of the glucose which is a substrate.

BEST AVAILABLE COPY

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-202764

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)9月4日

G 01 N 27/327

7235-2G G 01 N 27/30  
7235-2G  
7235-2G3 5 3 R  
3 5 3 J  
3 5 3 B

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全6頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサおよびその製造法

⑯ 特 願 平2-113316

⑰ 出 願 平2(1990)4月27日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)9月21日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-245630

⑳ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉑ 発 明 者	大 谷 真 由 美	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉒ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉓ 発 明 者	吉 岡 俊 彦	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉔ 発 明 者	飯 島 孝 志	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
㉕ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
㉖ 代 理 人	弁理士 栗野 重孝	外1名	

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

バイオセンサおよびその製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体の混合物からなる酵素反応層を設け、前記酸化還元酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定するバイオセンサ。

(2) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体の混合物からなる酵素反応層を設け、その上に、濾過層を付加し、前記酸化還元酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定するバイオセンサ。

(3) 濾過層が親水性高分子からなることを特徴と

する請求項2記載のバイオセンサ。

(4) 濾過層が多孔性の高分子層であることを特徴とする請求項2記載のバイオセンサ。

(5) 濾過層が界面活性剤を含むことを特徴とする請求項2記載のバイオセンサ。

(6) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知するバイオセンサにおいて、前記電極系上に親水性高分子溶液を塗布しその上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体の混合液を塗布、乾燥して酵素反応層を形成することを特徴とするバイオセンサの製造法。

(7) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学

的に前記電極系で検知するバイオセンサにおいて、前記電極系上に親水性高分子溶液を塗布、乾燥し、その上に親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体の混合液を塗布、乾燥して酵素反応層を形成することを特徴とするバイオセンサの製造法。

(8) 酵素反応層を形成後さらに高分子溶液を塗布して乾燥し濾過層を形成することを特徴とする請求項6または7記載のバイオセンサの製造法。

(9) 酵素反応層を30度から70度の雰囲気中で形成することを特徴とする請求項6または7記載のバイオセンサの製造法。

(10) 酵素反応層を乾燥気体中で形成することを特徴とする請求項6または7記載のバイオセンサの製造法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサに関する従来の技術

しさらに電子受容体の層を形成しているため反応する際、各層が溶解するのに時間を要し反応開始が遅れるため、測定時間が短縮できないという問題があった。

#### 課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するために、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体の混合物からなる酵素反応層を形成したことを特徴とする。

また、固形物を含む試料に対しては、その上に濾過層を付加するものであり、また酵素反応層については、親水性高分子溶液を塗布し、さらに親水性高分子と酵素と電子受容体の混合溶液を塗布乾燥することを特徴とする。

#### 作用

本発明によれば、電極系をも含めたディスポー

従来の、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量しうる方式として、第7図に示すようなバイオセンサを提案した。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系2、3を形成し、前記電極上に親水性高分子層6と酸化還元酵素層9と電子受容体層10からなる酵素反応層を形成したものである。試料液を酵素反応層へ滴下すると、酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

#### 発明が解決しようとする課題

この様な従来の構成では、試料液中に血球などの固形成分が含まれている場合、粘度が高いため反応が遅れたり、電極表面へ付着して電極反応に影響されて応答がばらついた。また、従来のバイオセンサの製造において、酵素反応層はあらかじめ親水性高分子層を形成後酵素の水溶液を塗布乾燥

ザブルタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液をセンサに添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。しかも、試料の添加時に濾過層において血球などの固形成分を除去し応答への影響がなくなり、安定した応答が得られる。さらに、酵素反応層を形成する際、酵素と電子受容体を混合しているため試料液が供給されると速やかに溶けて反応が始まるため、測定時間が短縮でき、バイオセンサの製造工程も簡易にできる。

#### 実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

#### <実施例1>

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図および第2図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、バイオセンサの斜視図と縦断面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定

極3からなる電極系を形成する。

次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3' (1 mm<sup>2</sup>)を残すように、絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理をして絶縁層4を形成する。

この電極系(2'、3')の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるCMC(カルボキシメチルセルロース)の水溶液を塗布し、さらにCMCに酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)と電子受容体であるフェリシアン化カリウムを溶かしたものを滴下し、40度で15分加熱乾燥して酵素反応層5を形成した。

上記のように構成したグルコースセンサに試料液としてグルコース標準液を酵素反応層5に5  $\mu$  l滴下し、1分後に対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5 Vの定電圧を印加し5秒後の電流を測定する。グルコース標準液によりフェリシアン化カリウムが溶解し、グルコースが酵素反応層において酸化される際、フェロシアン化カリ

これは加熱した場合は乾燥が速やかに行なわれるためフェリシアン化カリウムの粒子が細かい状態で均一に分布しているのに比べ、加熱しない場合は乾燥に長時間要するため、フェリシアン化カリウムが大きな結晶に成長し、これにより溶解速度が低下し反応速度が減少したと考えられる。

また、40度に加熱した場合900 mg/dlまで直線性が得られるため、短時間の加熱では酵素の活性に影響はない。加熱の温度を100度まで変化させ湿度は20%以下にコントロールしてバイオセンサを作製しグルコース濃度600 mg/dlにたいする1分後の応答を調べたところ、第3図に示すように、30度以上加熱すると応答電流が増加し、70度までは初期応答の劣化はみられなかった。80度以上に加熱すると応答が低下したが、これは酵素が熱により失活するためである。

また、酵素反応層を形成する際、乾燥に要する時間は、25度では25分かかったが、70度では5分と短縮できた。一方、ドライエアーを流した雰囲気の中で乾燥すれば25度でも15分で乾

ウムに還元される。そこで、上記の定電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。応答電流を測定したところ900 mg/dlという高濃度まで良好な直線性が得られた。従来の積層により酵素反応層を形成した場合には、900 mg/dlまで直線性を得るには、反応時間を2分必要とした。

これは、反応層が積層されているため、試料が供給され各層が溶解してから反応が始まるため、反応の開始が遅れているのが原因と考えられる。そこで、酵素と親水性高分子および電子受容体を混合し、酵素反応層を25度で乾燥させたところ、あらかじめ乾燥するのに25分かかった。45度で15分加熱乾燥して形成した酵素反応層と25度で25分乾燥した酵素反応層のバイオセンサについて応答を調べたところグルコース濃度が100 mg/dlにおいては加熱した方が30秒で反応が終了するのに比べ加熱しない方は1分近く反応が終了するのにかかった。

乾燥し、応答速度が改善され加熱温度を40度で作製したセンサと同様の応答が得られた。これは、乾燥気体により水分の蒸発が促進されたため、フェリシアン化カリウムなどの粒径が細かい状態で形成できたためである。

ドライエアーの代わりに窒素やアルゴンを通して同様の効果が得られた。さらに、加熱と併用することにより、70度まで加熱しなくても50度で5分と短時間に乾燥が終了し酵素活性への影響も軽減できた。さらに、乾燥時間が長くなると酵素反応層が電極表面から剝離する現象がみられたが、ドライエアーを導入して乾燥時間を短縮することで剝離を防ぐことができた。

#### <実施例2>

実施例1と同様に電極を形成後、電極系を覆うようにCMCの0.5%水溶液を塗布乾燥し第4図に示すように親水性高分子層(CMC層)6を形成した。さらに、CMC 0.5%水溶液1 gに酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD) 10 mgと電子受容体のフェリシアン化カ

リウム 20 mg を溶かしたものを滴下し、40 度で 10 分乾燥して酵素反応層 5 を形成した。実施例 1 では CMC を乾燥させないで GOD やフェリシアン化カリウムを滴下しているため、酵素反応層が CMC 層の広がりと同様に広がった。

そのため、酵素や電子受容体の単位面積当りの担持量を一定にするには CMC の広がりを制御する必要が生じたが、CMC を一旦乾燥すると同量の酵素反応層の成分を滴下すれば、ほぼ同じ面積に広がるため、そろった酵素反応層を形成することが可能になった。これは、センサを大量に生産する際メリットとなる。

また、一度 CMC を乾燥することにより、酵素反応層を乾燥するときの液量が少なくなるため、40℃7 分で乾燥が終了した。乾燥時間が短いほどフェリシアン化カリウムの粒径が細かく反応時に速やかに溶解できるため、短時間の測定が可能となった。また、加熱時間を短縮することにより、酵素への影響も小さくなるため、酵素反応速度の劣化を抑え、保存特性を維持するのに有効であっ

P の他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、澱粉系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は容易に水溶液とすることができるので、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を形成することができる。

さらに、エタノールの様な有機溶媒に溶解し塗布すると、酵素反応層を乱す事なく濾過層を形成でき、応答のばらつきも改善できた。濾過層を形成する際、酵素反応層を実施例 2 の製法で作製すると酵素反応層の広がりが制御されているため濾過層の広がりも制御が容易となった。

濾過層の材料を溶かす有機溶媒としては、トルエンやエタノール、石油エーテルなど、GOD 活性および印刷電極への影響の少ないものであればよい。

#### <実施例 4>

実施例 1 と同様に酵素反応層まで形成したセン

サ。さらに、ドライエアーの導入を併用することにより、実施例 1 と同様に乾燥時間の短縮ができた。

#### <実施例 3>

実施例 1 と同様にセンサを作製し、グルコース標準液のかわりに血液を用いたところ、直線性は変わらなかったが、直線性の傾きが 20% 低下し、応答のばらつきが増加した。血漿成分では直線性の傾きは変化しないため、これは、血球成分が電極付近に付着して電極反応に影響を与えたり、試料の粘度が高いために応答速度が低下したためと考えられる。さらに、血球とフェリシアン化カリウムの接触により僅かながら溶血がみられた。そこで、酵素反応層の上に、ポリビニルピロリドン (PVP) の 1% エタノール溶液を塗布、乾燥して第 5 図の 7 に示すような濾過層を形成した。PVP 層に血液を滴下するとその水分により PVP 層が膨潤し血球の電極部への影響を緩和でき、直線性の傾きが改善された。

濾過層を形成する際、親水性高分子として PVP

に濾過層としてポリスチレンの 0.05% トルエン溶液を塗布、乾燥した。ポリスチレンの膜は水溶性ではないため、血液により溶解することはない。

また、酵素反応層の表面のおうとつに対し、ポリスチレンの濃度が低いため多孔性の薄膜が形成でき、血球の濾過が可能となった。ポリスチレンの濃度を 1% まで高めると厚膜となり、多孔度も下がるため血球の濾過に時間がかかり反応の遅れがみられるため、薄膜にする必要がある。ポリスチレンのかわりにポリカーボネートでも多孔性の薄膜が形成でき血球が濾過できたが、ポリスチレンの方がトルエンにたいする溶解が大きいため濃度の調整が容易であった。水に溶けないで有機溶媒に溶け多孔性の薄膜を形成する材料としては、酢酸セルロースや、硝酸セルロースのようなセルロース類やポリ塩化ビニルも使用できた。

#### <実施例 5>

実施例 1 と同様に酵素反応層まで形成したセンサにポリスチレン 1% トルエン溶液 1 g に SiO<sub>2</sub> を

10 mg 混合した液を滴下し乾燥させて濾過層を形成した。血液を供給すると、ポリスチレンは溶けないが  $\text{SiO}_2$  が混在して隙間ができていたため血漿成分が濾過されて酵素反応層に到達した。 $\text{SiO}_2$  のかわりに  $\text{Al}_2\text{O}_3$  をもちいても同様な濾過層が形成できた。実施例4のように多孔性の薄層にすると速やかに血球が濾過できるが層が薄いため壊れ易い欠点があるが、厚膜にし  $\text{SiO}_2$  等の微粒子を加えることで濾過のスピードを低下することなく壊れにくいセンサを形成することができた。

#### <実施例6>

実施例1と同様に酵素反応層まで形成したセンサにポリスチレン0.01%トルエン溶液に0.1%レシチン(ホスファチジルコリン)を添加した液を滴下し乾燥させて濾過層を形成した。さらに、第6図に示すようにカバー8を設置した。カバー8と基板1の隙間は0.3mmに設定した。血液をカバーの先端部につけると、濾過層中のレシチンにより速やかにセンサ上に吸い込まれ濾過層全面に広がった。濾過層中に界面活性剤として

レシチンを加えることで、血液を速やかに広げることが可能になった。レシチンの代わりにポリエチレングリコールアルキルエーテル(商品名:トリトンX)を用いたところ0.5%以上あればレシチンと同様な効果が得られた。界面活性剤としては、前記の例のほかに、オレイン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなどが使用できる。カバーを設置することでカバー内の容積を小さくすることができ、サンプル量を微量にすることができた。さらにカバーで囲むことにより、外気と遮断できるためカバー内の試料の蒸発を防ぐことが出来た。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として実施例ではグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、等を用いることができる。また、電

子受容体として、上記実施例に用いたフェリシアニ化カリウムが安定に反応するので適しているが、P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が大きいので高速化に適している。また、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 $\beta$ -ナフトキノン4-スルホン酸カリウム、フェロセン等が使用できる。

#### 発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性高分子および電子受容体からなる混合溶液を塗布乾燥することで酵素反応層を形成し、さらに、濾過層を設け、あらかじめ生体試料中に存在する固形成分を除去して極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、測定精度を向上させたものである。また、濾過層を形成するとき界面活性剤を添加することにより、試料の展開を良好にできる。しかも、酵素反応層は、酵素と電子受容体を混合して形成しているため、両者が近接し

ており、反応速度が向上し、製造工程が簡略化できる。

#### 4. 図面の簡単な説明

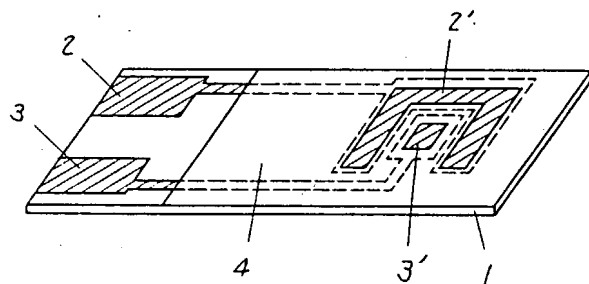
第1図は本発明の一実施例のバイオセンサの斜視図、第2図、第4図、第5図および第6図は同バイオセンサの縦断面図、第3図はバイオセンサの応答特性図、第7図は従来例のバイオセンサの縦断面図である。

1・・基板 2・・対極 3・・測定極 4・・絶縁層  
5・・酵素反応層 6・・親水性高分子層 7・・濾過層  
8・・カバー 9・・酵素層 10・・電子受容体層

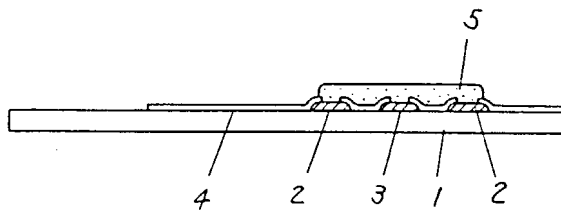
代理人の氏名 弁理士 栗野重孝 ほか1名

第 1 図

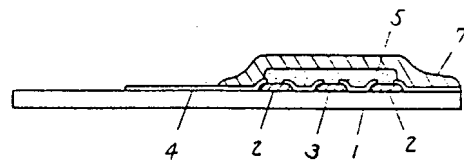
- 1 --- 基板
- 2 --- 対極
- 3 --- 測定極
- 4 --- 絶縁層
- 5 --- 酵素反応層



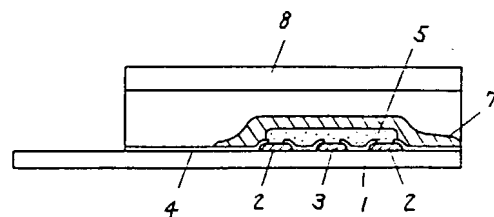
第 2 図



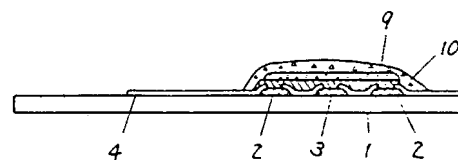
第 5 図



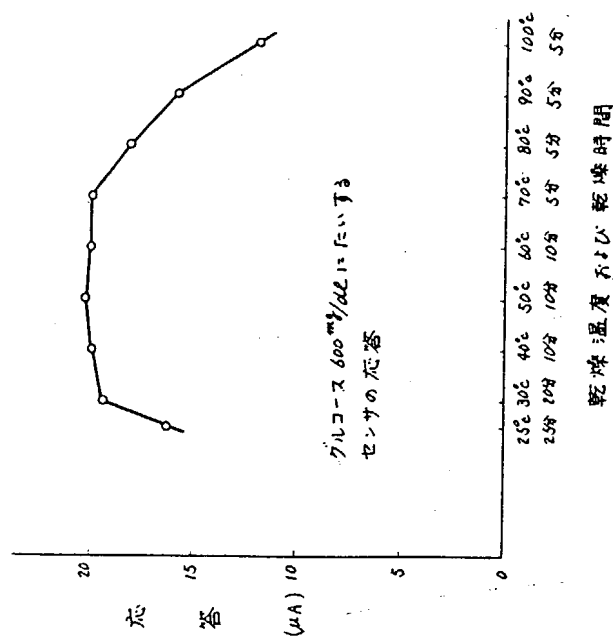
第 6 図



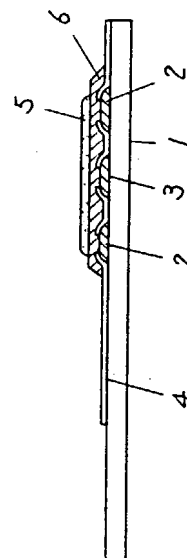
第 7 図



第 3 図



第 4 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**